

Eph- reseptorin kloonaus, tuotto ja puhdistus hyönteissoluista

Bio- ja Elintarviketekniikka

Biitekniikka

2012

Shevin Mamandi

EPH-RESEPTORIN KLOONAUUS, TUOTTO JA PUHDISTUS HYÖNTEISSOLUSTA

—



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2012 | 42

Ilari Suominen, Sari Paavilainen

Shevin Mamandi

EPH-RESEPTORIN KLOONAUS, TUOTTO JA PUHDISTUS HYÖNTEISSOLUISTA

Tämä opinnäytetyö tehtiin Joint Biotechnology Laboratoryssa osana Eph-reseptoreiden ja efriniiligandien sitoutusmis- ja rakennetutkimusta.

Opinnäytetyössä EphA2-reseptoriproteiinin koko geeni kloonattiin pMA152-a hyönteissoluektoriin ja transformoitiin *E.coli*-soluihin. Opinnäytetyössä tuotettiin yhdistelmä-DNA-plasmidi yhdistelmä-DNA-tekniikoilla.

Työssä käytettyjä hyönteissoluja olivat Sf9 ja Hi5. Sf9 soluja käytettiin viruksen tuotossa ja Hi5 soluja käytettiin efriniA5-ligandiproteiinin sekä EphA2-reseptoriproteiinin tuotossa.

Tuotettu efrini A5-ligandi puhdistettiin proteiini A-pylväällä ja EphA2-reseptori puhdistettiin Ni-pylväällä. Alkuvaiheessa EphA2 geenin c-terminaaliin oltiin kiinnitetty histidiinihantta, joka mahdollisesti proteiinin puhdistuksen nikkeligeelipylväällä.

Analysointiin käytettiin yhdistelmä-DNA-menetelmien aikana agarosigeelielektroforeesia. Proteiinin tuotto vaiheessa näytteet analysointiin SDS-PAGE ja Western blotting menetelmillä.

Aikaisemmissa opinnäytetöissä oli tuotettu ainostaan osaa Eph-reseptorista, mutta tässä opinnäytetyössä tuotettiin Eph-reseptorin koko geenin proteiinia ja analyysien perusteella proteiinin tuottaminen onnistui.

ASIASANAT:

(Eph-reseptorit, Hyönteissolut, Hyönteissoluektori, Efriniiligandit)

Shevin Mamandi

EPH RECEPTOR CLONING, PRODUCTION AND PURIFICATION FROM INSECT CELLS

This thesis was conducted at the Joint Biotechnology Laboratory as part of a research project concerning the attachment and conformation of Eph receptors and ephrin ligands.

In this thesis, the whole gene coding for the EphA2-receptor protein was cloned into a pMA152-a insect cell vector and transformed into *E.coli* cells. A recombinant DNA plasmid was produced by recombinant DNA plasmid methods.

The insect cells used in this study were sf9 and Hi5. Sf9 cells were used for the production of a virus and Hi5 cells for the production of the EphA2 receptor and ephrin ligand proteins.

The produced Ephrin-A5 ligand was purified with a protein A-column and the EphA2 receptor by affinity chromatography. A histidine tail was added to the C-terminal region of the EphA5 gene, which enabled the use of nickel affinity gel in the purification.

Agarose gel electrophoresis was used for the analysis of recombinant DNA methods. SDS-PAGE and western blotting were used for the protein analysis.

In previous Bachelor theses, parts of the Eph receptor have been produced. In the present study the entire gene coding for the protein was produced. According to the results the production was successful.

KEYWORDS:

(Insect cell, insect vectors, Eph-receptor, Ephrin ligand)

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	7
1.1 Eph-reseptorit ja efriniligandit	7
1.2 Hyönteissolut	9
1.3 Hyönteissoluektori	9
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	11
2.1 PCR koko geenistä	11
2.2 Digestio	14
2.3 Ligaatio ja transformaatio	16
2.4 Yhdistelmä-DNA-plasmidin analysointi digestiolla	18
2.4.1 Hyönteissolujen kasvatus	20
2.5 Bakulovirus Expressio systeemi	21
2.5.1 P0-virus	21
2.5.2 P1- virus.	22
2.5.3 P2-virus	23
2.5.4 P3-virus	23
2.5.5 EphA2:n tuotto	23
2.6 Efrini-ligandin tuotto	24
2.7 Lyysaus ja uutto	25
2.8 Alkukoe	26
2.9 Tuotoksen puhdistus affiniteettikromatografilla	27

2.10 Analysointi	27
2.10.1 Agaroosigeelielektroforeesi	27
2.10.2 SDS-page	28
2.10.3 Western blottaus	28
3 TULOKSET JA TARKASTELU	30
3.1 Koko geenin monistaminen PCR:llä	30
3.2 Proteiinien tuotto ja puhdistus	33
4 YHTEENVETO	39
LÄHTEET	40
5 LIITTEET	43

KUVAT

Kuva 1. EphA2-reseptorin kolmiulotteinen mallinnuskuva ³	8
Kuva 2. PacGP67-B bakulovirus transfektiovektorin geenikartta ⁸	10
Kuva 3. Yhdistelmä-DNA-plasmidin monistettava alue	19
Kuva 4. EphA2- geenin PCR	30
Kuva 5. 1-10 Minipreparaattien PCR	31
Kuva 6. Digestio 1,2,6 ja 10 Minipreparaateille	32
Kuva 7. Efrini- A5 proteiinin puhdistus	33
Kuva 8. Efrini A5 proteiinin puhdistus	33
Kuva 9. EphA2- reseptorin tuotto	34
Kuva 10. Alkukoe EphA2-proteiini tuotosta	35
Kuva 11. EphA2-reseptorin puhdistuksen affiniteettikromatogrammi	36
Kuva 12. EphA2-reseptorin puhdistus	37
Kuva 13. Western Blottaus EphA2:lle	37

TAULUKOT

Taulukko 2. PCR putkien sisältö	12
Taulukko 3. PCR-ajo-ohjelma	13
Taulukko 4. Digestio pipetoinnit	15
Taulukko 5. Uutos laimennokset	26

KÄYTETYT LYHENTEET

kDa	kilodalton
EphA2-reseptor	Ephrin type-A-reseptori 2
rpm	kierrosta minuutissa (revolutions per minute)
PCR	polymeraasiketjureaktio (polymerase chain reaction)
SDS-PAGE	natriumlauryylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesi
Sf9	hyönteissolukanta
Hi5	hyönteissolukanta
bp	emäspari

1 JOHDANTO

Tämän opinäytetyön tavoitteena oli kloonata, puhdistaa ja tuottaa EphA2-reseptoria Joint Biotechnolog Laboratoryssa rakennetutkimusta varten. Opinäytetyössä muodostettiin yhdistelmä-DNA-tekniikoilla yhdistelmä-DNA-plasmidi EphA2-geenistä ja hyönteissoluvektori pMA152-a:sta. EphA2-reseptoria ja efrini A5-ligandia tuotettiin BEVS-menetelmällä käyttäen sf9 ja Hi5 hyönteissolulinjoja sekä tuotettua reseptoria ja ligandia puhdistettiin affiniteettikromatografialla. Analysointiin käytettiin agaroosigeelielektroforeesia, SDS-PAGE:a ja Western blottausta.

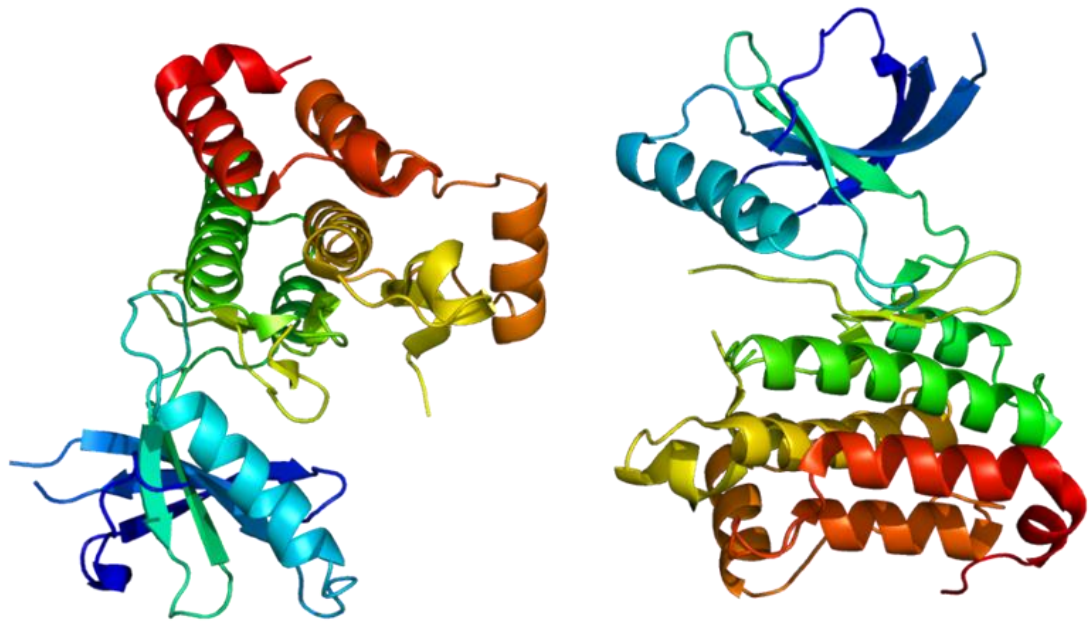
1.1 Eph-reseptorit ja efriniligandit

Tyrosiinikinaasireseptorit kuuluvat solukalvoproteiineihin ja tyrosiinikinaasit säätelevät toisten proteiinien aktiivisuutta fosforyloimalla proteiinien tyrosiineja.^{1,2}

Tyrosiinikinaasireseptoreiden suurperheeseen kuuluvat myös Eph-reseptorit ja efriniligandi. Eph-reseptorit ja efriniligandit jaetaan kahteen ryhmään A:han ja B:hen. Jako tapahtuu, joko niiden solun ulkoisten sekvenssien perusteella tai niihin sitoutuvien ligandien perusteella. Uudet näköhermot syntyvät, kun Eph-reseptorit ja niiden ligandit ohjaavat uusien aksonien liikettä verkkokalvolla. Tutkimukset ovat myös osoittaneet, että ne osallistuvat keskushermoston synapsien muodostumiseen.^{2,3,4}

Eph-reseptorit ovat proteiineja, jotka ovat kiinnittyneet solunkalvoon, ja on huomattu, että niiden singnalointi hillitsee aktiinin dynamiikkaa. Singnaalinvälityksellä reseptoreilla on kyky aktivoida useita solun osia samanaikaisesti.²

Tässä opinäytetyössä kloonattiin EphA2-reseptorin koko geeni ja kyseistä reseptoria sekä efrini-A5-ligandia tuotettiin Hi5-hyönteissoluissa.



Kuva 1. EphA2-reseptorin kolmiulotteinen mallinnuskuva ³

Kuvassa 1 nähdään tietokoneella tehdyn EphA2-reseptorin kolmiulotteinen rakenne.

Solu- ja molekyyalitasolla ei vielä täysin käsitetä Eph- ja efrinimolekyylien vuorovaikutusta. Kuitenkin on todettu, että Eph-efriini-interaktiot ottavat osaa syöpäkasvainten ja verisuonten kehittymisessä säätelemällä niiden kriittisiä vaiheita, joten niitä käytetään syöpää diagnosoitaessa ja niitä pidetään kohteina syövän hoidolle. Ne ovat mukana kudosten ja elinten varhaisessa kehityksessä, mutta ne säätelevät myös elinten toimintaa myöhemmissä vaiheissa. ²

Jos Eph-reseptoreiden ja efrinien toimintaan voitaisiin vaikuttaa, saataisiin aikaan merkittäviä lääketieteellisiä saavutuksia. Näitä reseptoreita voitaisiin käyttää terapeuttisessa mielessä kasvattamalla esimerkiksi uusien hermosolujen määrää. ²

1.2 Hyönteissolut

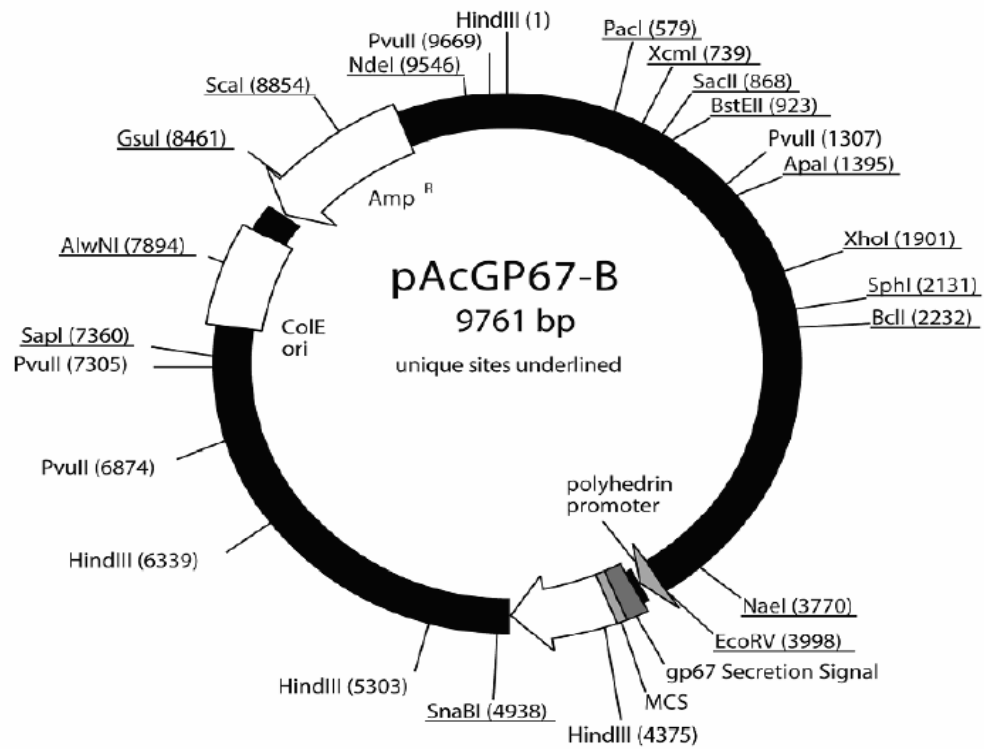
Hyönteissoluja käytetään humaaniproteiinin tuotannossa, koska niitä on helpompi viljellä ja ne ovat edullisempia kuin eläinsolut. Kun hyönteissoluun infektoidaan bakulovirus, se pystyy tuottamaan nopeasti suuria määriä haluttua proteiinia. Hyönteissoluilla ei ole insertin kokorajoitusta ja samanaikaisesti voidaan suorittaa useampi geeniekspressio.^{5,6}

Opinnäytetyössä käyttämäni hyönteissolulinjat olivat Hi5- ja Sf9-soluja. Hi5 solut ovat hyönteisen munasarjan soluja ja Sf9-solut ovat sen kotelovaiheen munasarjan soluja.^{5,6}

1.3 Hyönteissoluektori

Hyönteissoluektoirit ovat sukkulavektoreita, joita monistetaan ja joiden yhdistelmä-DNA-plasmidit rakennetaan *E. coli*-bakteerisoluissa. Hyönteissoluektoirissa on ennen geenin alkua promoottori, joka mahdollistaa yhdistelmä-DNA-plasmidin rekombinanttiproteiinin tuoton hyönteissoluissa.¹⁰ (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Opinnäytetyössäni käytin bakulovirusvektoria, pMA152-a, joka on muunneltu pAcGP67-B:stä (kuva 2) ja on kooltaan 9761 kb. pAcGP67-B hyönteissoluektoriin on liitetty thrombiiniproteaasin katkaisukohdan lisäksi Myc- ja Fc-täki (engl. Fc-tag, Myc-tag), jolloin Fc-täkiä voidaan käyttää rekombinanttiproteiinin puhdistamisessa apuna.¹⁰ (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)



Kuva 2. PacGP67-B bakulovirus transfektiovektorin geenikartta ⁸

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 PCR koko geenistä

Polymeraasiketjureaktio (PCR eli polymerase chain reaction) on in vitro-menetelmä, jolla voidaan kaksijuosteinen DNA-jakso monistaa eksponentiaalisesti. Menetelmä perustuu inkubaatioiden sarjaan, joka tehdään eri lämpötiloissa. Sillä voidaan monistaa pieni määrä DNA-jaksoa sopivaan konsentraatioon jatkotoimenpiteitä varten.^{4,9,10}

Kun PCR suoritetaan, tarvitaan siihen templaatti, jolla tarkoitetaan monistettavaa geenipätkää (tavallisesti kaksijuosteinen DNA-pätkä).¹⁰

PCR:n toimimiseen tarvitaan myös kaksi täysin tunnettua aluketta, jotka kiinnittyvät monistettavan geenipätkän alkuun ja loppuun eli siis koodattava geenipätkä jää alukkeiden sisälle. Alukkeet ovat kooltaan 15-40 nukleotidin kokoisia fragmentteja, jotka käynnistävät kopioimisen.¹⁰

DNA-polymeraasi kopioi templaatin sisältävän informaation muodostuvalle DNA-juosteelle. Polymeraasit ovat entsyymeja, jotka inaktivoituvat korkeissa lämpötiloissa, joten tämän takia PCR:ssä käytetään lämmönkestäviä polymeraaseja. DNA-polymeraaseja on kahdenlaisia, virheitä tekeviä ja vähemmän virheitä tekeviä eli oikolukuisia DNA-polymeraaseja. Oikolukuisia DNA-polymeraaseja suositetaan enemmän PCR:ssä.^{7,10}

PCR koostuu kolmesta perusvaiheesta: denaturointi, annealing ja pidennysreaktio, jotka muodostavat yhdessä syklin. Denaturaatio suoritetaan viemällä lämpötila korkealle, jolloin DNA-juosteet irtoavat toisistaan. Annealing vaiheessa lämpötilaa lasketaan hieman, jolloin alukkeet kiinnittyvät DNA-juosteisiin. Tämän jälkeen suoritetaan pidennysreaktio nostamalla lämpötila noin 72 °C:seen, jolloin putkessa olevat nukleotidit kiinnittyvät templaatin kumpaankin juosteeseen DNA-polymeraasin ohjaamassa järjestyksessä. Kun molemmat nauhat on monistettu, niin nostetaan lämpötilaa, jolloin kaikki

juosteet denaturoituvat noin 95°C:ssa ja seuraava sykli alkaa. Kun PCR suoritetaan jollekin tuottelle, se koostuu yleensä 15-40 syklistä riippuen siitä, kuinka paljon DNA:ta on käytettävissä ja paljonko sitä tarvitaan.¹⁰

Työssä monistettiin PCR:n avulla EphA2-reseptoriproteiinin koko geeni, joka toimi templaattina PCR:ssä. Geeniin c-terminaaliin päähän liitettiin histidiinihantä (histidiini-tag), jonka avulla pystyttiin helpommin puhdistamaan proteiini myöhemmässä vaiheissa.¹⁰

Alukkeina käytettiin A2FL-BamH1-QGK-for (Oligomer oy, 18,0 nmol, 100,0 pmol/μl) ja A2/FL/His-tag-rev (Oligomer oy, 9,7 nmol, 100,0 pmol/μl). DNA-polymeraasina käytettiin Phusion F-530s DNA-polymeraasia (Thermo, Lot 127, 2U/μl) ja nukleotideja 2mM dNTP's (Pharmasia) sekä käytettiin 5x phusion-puskuriliuosta (Finnzymes, contains 7,5mM MgCl₂, Lot 66).

Näytteitä valmistettiin PCR-reaktiota varten kahteen eri mikrosentrifuugiputkeen. Aineita pipetoitiin taulukon 1 mukaisesti, mutta toiseen putkista ei laitettu templaattia, koska se toimi kontrollina.

Taulukko 1. PCR putkien sisältö

Aine	määrä (μl)
H ₂ O	24
2 mM dNTP`S	5
EphA2-FC	1
F-530s DNA-polymeraasi	0,5
A2FL-BamHI-QGK-fo	5
A2/FL/His-tag	5
5x Phusion buffer	10

PCR ajoa varten tehtiin PCR-laitteelle oma ohjelma, joka on nähtävissä taulukossa 2.

Taulukko 2. PCR-ajo-ohjelma

Syklin vaihe	Lämpötila (°C)	Aika (min)
Alku denaturointi	98	5
Denaturointi	98	1
Anniilaus	55	1
Ekstensio	72	3
Loppu ekstensio	72	10
Lopetus	4	
Sykliä määrä: 35		

Kun PCR-ajo oli päättynyt, tarkistettiin agarosigeelielektroforeesilla, oliko tuotto onnistunut. Valmistettiin agarosigeeli Liitteen 1 ohjeiden mukaan. Mikrosentrifuugiputkista otettiin 5 µl näytettä kahteen uuteen putkeen ja lisättiin niihin 2µl 6x DNA-LB-väriä, joka sisälsi bromifenolisinistä (väri) ja glyserolia. Glyseroli saa näytteet pysymään kaivossa tekemällä ne raskaammiksi. Agarosielektroforeesigeelin kuoppiin pipetoitiin näytteet sekä niiden lisäksi kahteen kuoppaan pipetoitiin 5 µl λ-DNA-standardia, joka oli digestoitu ECORI- ja HindIII-restriktioentsyymeillä. λ-DNA-standardi on markkeri, joka on digestoitu ja sen DNA-fragmenttien koot tiedetään. Ajo suoritettiin 100 voltilla noin 30 minuuttin ajan. Ajon jälkeen tarkistettiin, oliko PCR tuotteessa oikeata geeniä, joten geeli kuvaattiin (Kuva 4) geelinkuvantamislaitteella.^{7,10} (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Haluttu geeni puhdistettiin kaupallisella spin-kolonilla Gene jet™ PCR purification kitillä (Fermentas, Lot 00039781), johon on sidottuna kiinni

silikamatriksi. Kaotroopin läsnäollessa silikamatriksiin kiinnittyy nukleiinihapot suuressa ionivahvuudessa.¹⁰

Ensin haluttu DNA-pala leikattiin agarosigeelistä ja punnittiin. Geelipala sulatettiin lämpöblokissa ja sen jälkeen lisättiin sitoutumispuskuria (Fermentas, Lot 00039250) yhtä paljon (eli suhteessa 1:1). Näytettä sentrifugoitiin noin 60 sekuntia, jolloin DNA tarttui silikaan. Kolonnista pestiin epäpuhtaudet 700 µl:lla pesupuskuria, johon oli ennen käyttöä lisätty 96 prosentista etanolia (30.11.09, EVE), Fermentas, Lot 00039252). Pesupuskurin lisäyksen jälkeen näytettä sentrifugoitiin noin 60 sekuntia. Pesu suoritettiin kahdesti. Pesun jälkeen geeni eluoiitiin kolonnista 50 mikrolitralla eluointipuskuria (Fermentas, Lot 00039253) ja sentrifugoitiin lopuksi 1 minuutin ajan.¹⁰

2.2 Digestio

Digestiolla tarkoitetaan restriktioentsyymien käyttöä DNA-jakson katkaisemista varten. Restriktioentsyymillä voidaan katkaista insertti ja käytettävä plasmidi tietyistä kohtaan (katkaisukohta on oltava käytettävän plasmidin rakenteessa), jolloin voidaan liittää insertti vektoriin ligaation avulla. Syy, miksi restriktioentsyymejä käytettiin yhdistelmä-DNA-plasmidia muodostaessa, on se, että kyseiset entsyymit tunnistavat kaksinauhaisesta DNA:sta oikean nukleotidijärjestyksen, josta ne katkaisevat DNA:n.^{10,12}

Työssä restriktioentsyyminä käytettiin BamHI:tä (*Bacillus amyloliquefaciens*-bakteerikannan H restriktioentsyymi I)¹⁰, jonka tunnistussekvenssit ovat:

5' GGATCC 3'

3' CCTAGG 5'¹⁰

Tunnistuskohda rakennettiin inserttiin PCR:n avulla ja vektorina käytettiin pMA152-a hyönteissoluektoria, jossa oli valmiina tälle restriktioentsyymille katkaisukohta.¹⁰

Työ suoritettiin pipetoimalla toiseen eppendorf-putkeen vektori, BamHI-puskuria (Fermentas, Lot 00015726), Milli-Q-vettä ja restriktioentsyymiä BamHI (Fermentas, Lot 00027469) ja toiseen sama määrä tuotteita paitsi vektorin tilalle inserttiä. Tuotteita pipetoitiin eppendorf-putkiin taulukon 3 mukaisesti. Pipetoinnin jälkeen tuotteet sentrifugoitiin pohjaan ja näytteitä inkuboitiin lämpökaapissa 37 °C:ssa kahden tunnin ajan.

Taulukko 3. Digestio pipetoinnit

Aine	Määrä (µl)
BamHI-puskuri	3
BamHI restriktioentsyymi	0,5
Milli-Q-vettä	16,5
Vektori tai Insertti	10
kokonaistilavuus	30

Inkuboinnin jälkeen restriktioentsyymi inaktivoitiin laittamalla putket 65 °C:n lämpökuoppaan 15 minuutin ajaksi.

Valmistettiin agaroosigeeli Liitteen 1 ohjeen mukaisesti. Ennen ajoa suoritettiin vektorille alkaalinen fosfataasi käsittely, jolla poistettiin vektorin päästä fosfaatti eli 5'-fosfaattiryhmä. Tämän toimenpiteen avulla ligaasin toiminta estetään ja vektorin päät eivät kiinnity ligaation aikana toistensa kanssa. Vektorin joukkoon pipetoitiin 1µl CIAP:ta (Calf Intestin Alkaline Phosphatase, Fermentas, #EF 0341, 1 U/µl, 200 U, lot 2524) ja inkuboitiin 35°C:ssa 30 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen suoritettiin putkelle 85° C:ssa lämpökäsittely lämpöblokissa 5 minuutin ajan, jolloin alkaalinen fosfataasi inaktivoituu.

Insertin ja vektorin joukkoon laitettiin 6X DNA-LB-väriä ja ne pipetoitiin geelin kuoppiin. Yhteen kuoppaan pipetoitiin myös 5 µl λ-DNA-standardia ja

suoritettiin ajo 100 voltissa 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen geeli kuvattiin, jotta nähtäisiin, onko digestio onnistunut.

2.3 Ligaatio ja transformaatio

Ligaatiolla tarkoitetaan kahden DNA-jaksojen liittämistä toisiinsa entsyymien avulla kovalenttisin sidoksin. DNA-jaksojen kiinnittymisen mahdollistaa se, että niiden toisessa päässä on 5'-fosfaattiryhmä ja toisessa 3'-OH-ryhmä, jotka tunnistavat sopivat päät ja kiinnittyvät toisiinsa. Näitä ligaatiossa käytettyjä entsyymejä sanotaan DNA-ligaaseiksi.¹⁰ Työssä käytettiin T4 DNA-ligaasia, joka on entsyymi, jota *E.colin* T4-faagi tuottaa.¹⁰

Ligaatio suoritettiin pipetoimalla eppendorf-putkeen 2 µl digestoitua plasmidia, 6,5 µl digestoitua inserttiä (insertin ja vektorin suhteen on oltava noin 1:3), 1 µl 10x ligaatio puskuria (T4-buffer, Fermentas) sekä 0,5 µl T4 DNA ligaasia (Fermentas, #EL00II, Lot 00001059). Kokonaistilavuus oli siis 10 µl. Yksi negatiivinen kontrolliputki tehtiin, jonne laitettiin kaikki samat kuin edellisessä putkessa, mutta insertin tilalle pipetoitiin Milli-Q-vettä. Näytteet sentrifugoitiin putkien pohjaan ja niitä inkuboitiin yksi tunti huoneenlämpötilassa. Tämän jälkeen ligaasi inaktivoitiin lämpöshokilla lämpöblokissa 65 °C:ssa 15 minuutin ajan.

Transformaatiolla tarkoitetaan geenin vaihtamista tai vieraan geenin tuottamista soluissa, jotka pystyvät ottamaan vastaan vierasta DNA:ta. Näitä soluja kutsutaan kompetenttisoluiksi ja ne on käsitelty kylmällä CaCl_2 :lla, jonka jälkeen niistä on tullut kompetentteja.¹⁰

Transformaatio kompetentteihin *E. coli*-soluihin (XL1-blue, 14.4.10, EVE) aloitettiin ottamalla -70°C pakkasesta kaksi tilavuudeltaan noin 50 µl:n erää *E. coli*-soluja ja laittamalla ne suoraan jäihin, joista toiseen pipetoitiin 10 µl näytettä kontrolliputkesta ja toiseen putkeen pipetoitiin sama määrä putkesta, jossa on vektori ja siihen liitetty insertti. Putkia inkuboitiin jäissä noin 30 minuuttia, jonka jälkeen niille suoritettiin lämpöshokki 42 °C:ssa 45 sekunnin ajan. Välittömästi

lämpöshokin jälkeen soluja inkuboitiiin jäissä kahden minuutin ajan. Soluihin lisättiin inkubaation jälkeen SOC-mediumia, joka sisälsi 5,5 g tryptonia (Biokard diagnostics, Lot 9E524), 1,25 g hiivauutetta (Biokard diagnostics, Lot 3E946), 2,5 g NaCl (J.T.Baker, Lot 100183009), 250 ml vettä ja 12,5 µg/ml tetrasykliiniä.

Mediumin lisäyksen jälkeen soluja inkuboitiiin ravistelijassa yhden tunnin ajan, jonka lämpötila oli 37 °C ja ravistelunopeus oli 225 rpm. Tämän jälkeen suoritettiin molemmille putkille 10^0 ja 10^{-1} laimennokset, jotka pipetoitiin LA-maljoille.

LA-maljoja varten valmistettiin agar, johon laitettiin 3,5 g Tryptonia (Biokard diagnostics, Lot 9E524), 1,25 g hiivauutetta (Biokard diagnostics, Lot 3E946), 2,5 g NaCl (J.T.Baker, Lot 100183009), 250 ml vettä ja 3,75 g agaria (Becton Dickinson, Lot GM0084). Agar-liuos steriloitiin (20min, 121°C), ja jäähdtyksen jälkeen noin 50°C asteeseen, siihen lisättiin 1 ml ampisilliiniä (25mg/ml), jolloin LA-maljat valmistettiin kaatamalla agaria maljoille.

Maljoja inkuboitiiin yön yli 37°C:ssa. LA-maljoja käytettiin transformaatioissa sen takia, että vain ne solut kasvavat maljoilla, joissa on tapahtunut transformaatio eli ne sisältävät haluttua DNA:ta kiinnittyneenä plasmidiin. Muiden solujen, joissa ei ole plasmidia, kasvun estää ampisilliini, mutta solut, joissa on vektoria kasvavat, koska plasmidi tuottaa β-laktamaasia, joka tekee siitä ampisilliiniresistenssin. Kontrollilla testattiin, kuinka paljon transformaatioissa oli taustaa. Koska kontrollimaljalla oli vähemmän kasvua kuin toisessa maljassa (plasmidi + insertti), voitiin todeta, että transformaatio oli onnistunut.

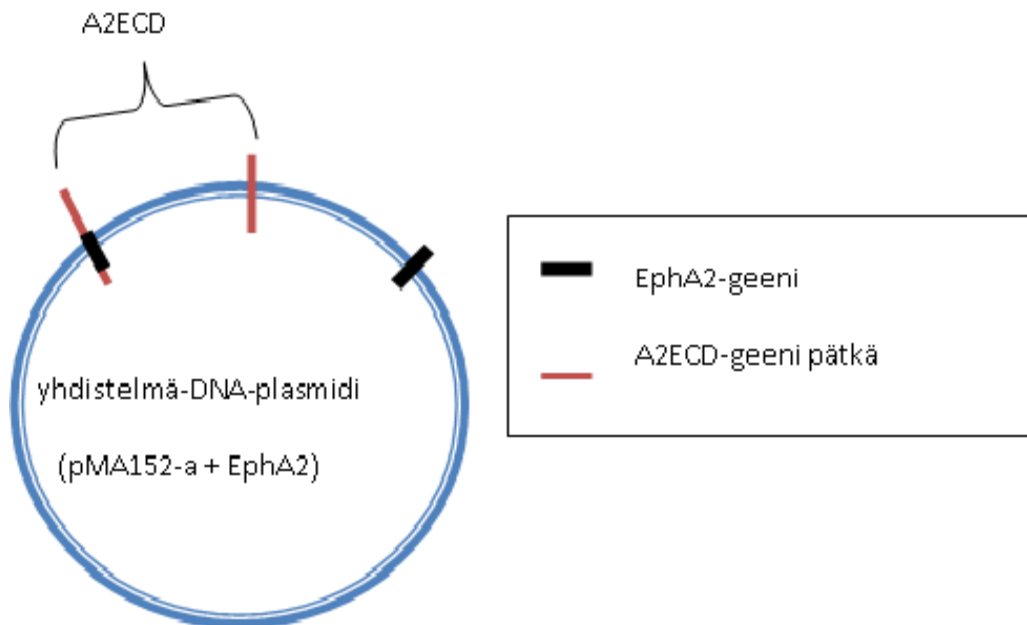
Minipreppien tekemisellä tarkoitetaan DNA:n eristämistä bakteeriviljelmästä. Minipreppien tekeminen aloitettiin transformaatioissa viljellyistä pesäkkeistä pipetoimalla ensin kymmeneen falconputkeen 5 millilitraa LB-mediumia (trypton 2.5g,hiivauute 1.25g, NaCl 2.5 g ja H₂O 250ml) ja 20µl ampisilliinia (25mg/ml). Tämän jälkeen otettiin maljalta (vektoria+inserttiä sisältävät solut) 10 eri pesäkettä silmukalla ja liuotettiin ne falkkonputkiin. Pesäkkeitä inkuboitiiin falkkonputkissa lämpöravistelijassa 37 °C:ssa 250 rpm:ssä yön yli.

Falkkonputket sentrifugoitiin 4 °C:ssa 4000 g:ssä 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen supernatantit kaadettiin pois ja aloitettiin puhdistus GenElute™ plasmid miniprep-kitillä (Sigma, Lot PLN350), jolla erotettiin plasmidit soluista ja muista jätteistä. Pelletit liuotettiin 200 µl:an resuspensiopuskuria ja pipetoitiin liuotetut näytteet eppendorf-putkiin. Joukkoon lisättiin 200 µl lysis-puskuria (Sigma, Lot 037K6123) ja näytteitä sekoitettiin käsin kääntelemällä 3 minuuttia. Laitettiin joukkoon 350 µl sitoutumispuskuria (Sigma, Lot 047K6084) ja sentrifugoitiin 10 minuuttia 12000 g:ssä.

Seuraavaksi otettiin 10 kolumnia, niihin pipetoitiin 500 µl preparation-puskuria (Sigma, Lot 6641570EA) ja niitä sentrifugoitiin yhden minuutin ajan 12000 g:ssä. Kolonneihin pipetoitiin näytteet ja niitä sentrifugoitiin yksi minuutti 12000 g:ssä. Supernatantit kaadettiin pois ja näytteet pestiin pipetoimalla jokaiseen kolonniin 750µl pesupuskuria (Sigma, Lot 037K6156). Näytteitä sentrifugoitiin yhden minuutin ajan 12000 g:ssä ja kaadettiin supernatantit pois. Pesu toistettiin kahdesti. Lopuksi plasmidit eluoitiin kolonneista eluointipuskurilla (Sigma, Lot 077K6172). Kolonneihin pipetoitiin 100µl eluointipuskuria, jonka jälkeen niitä sentrifugoitiin minuutin ajan 12000 g:ssä.

2.4 Yhdistelmä-DNA-plasmidin analysointi digestiolla

Minipreparaateille suoritettiin PCR aiemmin käytetyn ohjelman mukaan (Taulukko 2), jotta saataisiin selville, oliko eristettyjen minipreparaatien plasmideissa oikea geeni (EphA2). PCR:llä monistettiin 1500 bp:n mittainen A2ECD-geenipätkä EphA2-geenistä. Koe suoritettiin laittamalla reaktioputkeen alukkeet, joista toinen kiinnittyi EphA2-geenin ulkopuolelle vektoriin ennen kloonauksohtaa ja toinen kiinnittyi geenin sisäpuolelle (Kuva 3). PCR:n jälkeen valmistettiin agaroosigeeli Liitteen 1 ohjeiden mukaan ja ajo suoritettiin 100 voltissa noin 30 minuuttia. Ajon jälkeen geeli kuvattiin (Kuva 5).



Kuva 3. Yhdistelmä-DNA-plasmidin monistettava alue

Minipreparaatit digestoitiin restriktioentsyymillä BamHI. Digestion tarkoitus oli testata, oliko minipreparaateissa oikeaa inserttiä. Kun yhdistelmä-DNA-plasmidit digestoitiin samalla restriktioentsyymillä kuin aikaisemmin, saatiin niistä oikean kokoinen DNA fragmentti näkyviin, kun agarosielektroforeesi geeli oli kuvattu. (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Työ aloitettiin pipetoimalla 7µl yhdistelmä-DNA-plasmidia, 2 µl BamH1 puskuria (Fermentas, Lot 00015726), 10.5 µl milli-Q-vettä ja 0,4 µl restriktioentsyymiä BamHI (Fermentas, Lot 00027469) eppendorf-putkiin. Digestion jälkeen näytteisiin lisättiin 4 µl 6xDNA-LB-väriä ja pipetoitiin 12µl näytettä kuoppiin. Yhteen kuoppaan pipetoitiin myös 5 µl digestoitua λ-DNA:ta kontrolliksi. Valmistettiin geeli Liitteen 1 ohjeiden mukaisesti. Ajettiin geeliä noin 30 minuuttia, jonka jälkeen se kuvattiin (Kuva 6) ja todettiin, että osassa näytteistä näytti olevan oikeata inserttiä. Tämän jälkeen lähetettiin neljä yhdistelmä-DNA-

plasmidia sekvensoitavaksi biotekniikan keskuksen sekvensointipalveluun (Biocityn 5 kerrokseen).

2.4.1 Hyönteissolujen kasvatus

Otettiin Hi5- ja sf9-hyönteissoluampullit nestetypestä ja herätettiin ne henkiin seuraavalla tavalla. Sulatettiin käsissä 1 ml:n Hi5-hyönteissoluampulli, pipetoitiin se 250 ml erlenmeyeriin, johon lisättiin 20ml Insect Xpress-mediumia ja lopuksi inkubointiin elenmeyeria 27°C:ssa 100rpm:ssä muutaman päivän ajan. Hi5 solut kaksinkertaistuvat noin vuorokaudessa. (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Sf9-hyönteissoluampulli sulatettiin (STA,NY 29.8.09) samoin kuin Hi5-solut, mutta ampullin sisältö pipetoitiin petrimaljalle ja solujen päälle lisättiin 5 ml Insect SF-4 Baculo Express kasvuliuosta (promcell, Lot E05196P). Maljaa inkuboitii yhden tunnin ajan 27 °C:ssa, jotta solut tarttuvat maljan pohjalle. Yhden tunnin inkubointi johtuu siitä, että solut oli pakastettu kasvuliuokseen, joka sisältää DMSO:ta. Se säilyttää solut pakasteessa hyvin, mutta sulaneena se on haitallinen soluille. Tämän takia soluliuos pipetoitiin maljalta uudelle maljalle ja solujen päälle lisättiin uutta mediumia. Toiselle maljalle suoritettiin sama tunnin inkubointi, joka jälkeen pipetoitiin soluliuos pois ja laitettiin uutta mediumia tarttuneiden solujen päälle. Sf9-solut kaksinkertaistuivat noin kahdessa vuorokaudessa. (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Solujen tiheyttä pidettiin 0,5-6,0 miljoonaa solua/ml ja ne laimennettiin joka toinen päivä 0,8 miljoonaa solua/ml, jolloin ne pärjäävät muutaman päivän. Solujen kasvatuksen aikana laimennettaessa niihin lisättiin myös penisilliini/streptomysiini (Pen/ strep, penicilliini streptomycin, Lot Be12-730Q) antibioottia. (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Solut laskettiin pipetoimalla Bürker-kammioon 10 µl soluliuosta, jolloin saadaan laskettua mikroskoopilla kammion ruudukoiden avulla, kuinka paljon soluja on 1 millilitrassa soluliuosta.

2.5 Bakulovirus Expressio systeemi

Hyönteissoluja voidaan infektoida bakuloviruksella, joka ei lisäännä hyönteissolun ulkopuolella. Ne ovat rakenteeltaan kapselimaisia ja ne sisältävät sirkulaarisen genomin. BEVS-menetelmässä (Bakulovirus Expressio systeemi) vektorina on bakulovirus, jota tuotetaan hyönteissoluissa ja siirretään toiseen hyönteissoluun tuotettavaksi. Bakuloviruksen avulla pystytään tuottamaan runsaasti haluttua proteiinia lyhyessä ajassa.^{6,13}

Haluttua bakulovirusta tuotettiin neljässä vaiheessa, jonka jälkeen se siirrettiin hyönteissoluun, jossa haluttua proteiinia (EphA2) tuotettiin.

Kun virukset pipetoidaan solujen joukkoon, tunkeutuvat virukset endosytoosin avulla aktiivisiin soluihin ja infektoidessaan, soluissa alkaa monistumaan virusta kunnes solujen tumat turpoavat ja solujen jakautuminen päättyy. Tämä johtaa solujen kuolemaan.^{6,14}

Opinnäytetyössä tuotettiin virus ja se infektoitiin hyönteissoluun eli suoritettiin BEVS eli bakulovirusekspressio. Näistä kaikista vaiheista otettiin näytteitä ja lopuksi suoritettiin SDS-PAGE määrittäminen Liitteen 2 ohjeiden mukaisesti.

2.5.1 P0-virus

Pipetoitiin kuoppalevyille (Cell star greinen bio-one lot E1011021, Cat 662160, 24 well cell culture plate) sf9-hyönteissoluja kahdeksaan kuoppaan (3.31 miljoonaa solua/ml) 0.67 miljoonaa solua per kuoppa eli 202µl ja laitettiin joukkoon sf-4-baculo express mediumia (with L-glutamine) lot E0519p). Inkuboitiin 27 °C:ssa yhden tunnin ajan.

Inkuboinnin aikana otettiin kaksi eppendorffputkea, joista toiseen putkeen pipetoitiin 3µl plasmidia, jossa oli insertti. Samaan putkeen pipetoitiin myös 1µl BaculoGoldia (linearized baculovirus DNA, Lot 53226) ja inkuboitiin viisi minuuttia. Inkuboinnin jälkeen lisättiin 40µl grace's insect mediumia (unsupplemented 1x, GIBCO 11595, Lot 374516). Toiseen tuubiin pipetoitiin 40µl grace's insect mediumia ja 4.2µl cellfectin reagenssia (inritrogen, Lot 378577). Molempien eppendorff-putkien sisältö yhdistettiin ja inkuboitiin huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan. Kuoppalevytä pipetoitiin (aikaisemmin oli pipetoitu kahdeksaan kuoppaan sf9-soluja ja sf-4-express-mediumia ja inkuboitu niitä yksi tunti) medium pois ja pestiin kuopat 400 µl:lla grace's mediumia. Medium pipetoitiin pois ja ykkös- sekä kakkoskuoppiin pipetoitiin 204 µl/kuoppa eppendorffputken (sisältää yhdistelmä-DNA-plasmidin sekä BaculoGold-DNA:n eli näytteen) sisällöstä. Loppuihin kuuteen kuoppaan pipetoitiin 204µl grace's mediumia, joita käytettiin kontrollina. Näytteitä inkuboitiin 27 °C:ssa viiden tunnin ajan ja vaihdettiin kuoppien medium 400 µl:an sf4-mediumia (promcell, Lot E05196P). Viruksen kehittymistä tarkkailtiin päivittäin. Kun infektoituneet solut alkoivat vähitellen turvota ja kuolla, poistettiin infektoituneet solut ensimmäisestä ja toisesta kuopasta kahteen falkkonputkeen ja sentrifugoitiin niitä viiden minuutin ajan 4000 rpm:ssä. Supernatantit säilytettiin 4 °C:ssa.

2.5.2 P1- virus.

Otettiin kuuden kuopan kuoppalevy ja pipetoitiin jokaiseen kuoppaan 3 miljoonaa sf9-soluja (1.64 miljoonaa solua/ ml) eli 1.9 ml ja inkuboitiin yhden tunnin ajan. Pipetoitiin kuoppiin yksi ja kaksi 450 µl P0-virusta, 2,55 ml sf4-mediumia sekä 30µl penicilliini streptomyciniä. Kontrolleiksi otettiin loput neljä kuoppaa, joihin pipetoitiin vain 3 ml sf4-mediumia sekä 30 µl penicilliini streptomyciniä. Inkuboitiin kuoppalevy 27 °C:ssa niin kauan, että infektoituneet solut alkoivat vähitellen turvota ja kuolla. Tämän jälkeen poistettiin infektoituneet solut ensimmäisestä ja toisesta kuopasta kahteen falkkonputkeen ja

sentrifugoitiin viiden minuutin ajan 4000 rpm:ssä. supernatantit säilytettiin 4 °C:ssa.

2.5.3 P2-virus

Otettiin 15cm halkaisijaltaan oleva malja ja pipetoitiin siihen 36 miljoonaa sf9-solua ja inkuboitiin maljaa yhden tunnin ajan, jotta solut tarttuisivat maljan pohjaan. Inkuboinnin jälkeen maljalle pipetoitiin 1 ml P1-virusta ja 25 ml Insect express mediumia sekä 250 µl penicilliini streptomyciniä. Maljaa inkuboitiin 27°C:ssa, kunnes soluissa tapahtui muutos niinkuin aikaisemmissa virustuotoissa (P0- ja P1-virus), jonka jälkeen raaputettiin maljalta solut irti ja pipetoitiin ne falkkonputkiin ja sentrifugoitiin viiden minuutin ajan 4000 rpm:ssä. Osa supernatantista otettiin talteen ja pakastetiin.

2.5.4 P3-virus

Pipetoitiin isolle maljalle (cellsfar, tissue culture ps, 145x20 mm, Lot EIQ1008x,Cat 639160) 40 miljoonaa solua ja inkuboitiin tunnin ajan, jotta solut tarttuisivat pohjaan. Kun solut olivat tarttuneet maljan pohjaan, pipetoitiin tarttumattomat solut pois. Pipetoitiin maljalle 1 ml P2-virusta, 20ml insect express mediumia sekä 250 µl penicilliini streptomyciniä. Inkuboitiin maljaa 27°C:ssa, kunnes soluissa tapahtui muutos, jonka jälkeen solut raaputettiin maljalta irti. Pipetoitiin ne falkkonputkiin ja sentrifugoitiin viiden minuutin ajan 4000 rpm:ssä, jonka jälkeen supernatantti otettiin talteen proteiinin tuottoa varten.

2.5.5 EphA2:n tuotto

Pipetoitiin 6ml P3-virusta Hi5-solujen (300 ml) joukkoon ja laitettiin kasvamaan 100rpm:n 27°C:n. Kun solut olivat kasvaneet muutaman päivän, solut

sentrifugoitiin 4500 rpm:ssä 4°C:ssa 30 minuutin ajan. Supernatantti otettiin talteen ja laitettiin jäihin odottamaan.

2.6 Efriini-ligandin tuotto

Hi5 hyönteissolussa tuotettiin efriniligandia (Turun yliopistossa biologiaa opiskeleva tyttö, joka työskenteli JBL:ssä oli suorittanut kaikki geenin kloonauksen työvaiheet, joita on tehty tässä opinäytetyössä EphA2-reseptorin geenille), joka aktivoi EphA2-proteiinia.² Otettiin erlenmeyer-pullo, johon laitettiin 400 ml Hi5-soluja ja 400ml Insect-Xpress mediumia sekä 8 ml penicilliini streptomycini-antibioottia. Erlenmeyerpullon sisältö jaettiin kahteen erlenmeyerpulloon, lisättiin kumpaankin 8 ml virusta (Efrin A5 p4, 1.11.10, Laura) ja inkuboitiin lämpöravistelijassa 48 tuntia 27 °C:ssa 100 rpm:ssä. Molemmista erlenmeyerpulloista otettiin 1ml:n näyte analysointia varten (sentrifugoidaan ennen analysoimista 10 minuuttia 4000rpm:ssä). Inkuboinnin jälkeen pullot sentrifugoitiin 4000 g:ssä 30 minuutin ajan ja supernatantti otettiin talteen. Sentrifugointi suoritettiin, jotta saataisiin efrini-A5-ligandiproteiini erotettua Hi5 soluista.

Efriini puhdistettiin proteiini A-agarosipylväällä (rProteine A sepharose gel), johon tarttuu efrinissä oleva Fc-täki (engl. Fc-tag). (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Tarvittavat liuokset olivat valmiina sekä pylväs oli koottu ja tasapainoitettu valmiiksi. Proteiini A-pylväässä oleva 20% etanoli pestiin Milli-Q-vedellä virtausnopeudella 1ml/minuutti ja tasapainoitettiin 10ml aloituspuskuria, PROT A-puskuria (20mM Hepes, 0,5 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, pH 7.3, 03.05.2011.Sari). Tasapainotuksen jälkeen ajettiin 730 ml:n efrini-kasvatus virtausnopeudella 0,5 ml/minuuttia 22 tunnin ajan pylvään läpi.

Ajon jälkeen otettiin talteen läpitullut fraktio siltä varalta, että efrini ei olisi tarttunut pylvääseen. Pylväs pestiin 10 ml:lla tasapainoituspuskuria. Huuhtominen suoritettiin, koska tasapainoituspuskuri sisälsi NaCl:a, joka estää

ionivarauxsiin perustuvan tarttumisen pylvääseen eli epäspesifisen tarttumisen. Näyte eluoiitiin 10ml:lla eluointipuskuria (0,1 M glysiini, 0.5 M NaCl, 2,5 mM MgCl₂, pH3, 2.5.2011,Sari) ja fraktiot kerättiin kymmeneen eppendorffputkeen (2ml fraktio/putki).

2.7 Lyysaus ja uutto

Lyysauksella tarkoitetaan solujen hajoittamista palasiksi, jolloin proteiini on helpompi poistaa soluosista uuttamalla.¹¹ EphA2-reseptorin tuottovaiheen solut pestiin 30 ml:lla pesupuskuria (10mM Hepes, 20mM KCl, 10mM MgCl₂) (medumia ja muuta pestiin pois) ja sentrifugoitiin 15000 rpm:ssä 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen liuotettiin solut 20 ml:an lysis-puskuria (50mM Hepes, 1M NaCl, 1M KCl) solut imevät sisälleen puskuria ja lisättiin joukkoon 50 µl proteaasi-inhibiittoria (Sigma fast protease inhibitor, Lot 9242291090), joka estää proteaasia plkkomasta tuotettavaa proteiinia. Mukaan laitettiin myös 100µl DNAasia (100U/mg, 20.6.11, Sari), jota käytettiin, koska haluttiin sen pilkkovan DNA:ta pois. (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Solut sentrifugoitiin 15000 rpm:ssä 30 minuutin ajan, jonka jälkeen kaadettiin supernatantti (otettiin ainostaan analysoimista varten 1ml talteen) pois. Pellettiä uutettiin 20ml:lla lyysis-puskuria, johon lisättiin myös 100 µl proteaasi inhibiittoria. Joukkoon laitettiin myös 40mg kolesteryyli-vety-sukkinaatti (Mpbio, Lot 9519H) ja 100mg n-dodekyyli-β-D-maltosidia (Biotop, Lot Cu633). Ne ovat detergenttejä, jotka hajottavat solun membraanirakennetta ja proteiinit alkavat irrota solukalvosta. Pellettejä uutettiin sekoittajassa yön yli ja seuraavana päivänä ne sentrifugoitiin 55 minuutin ajan 19000 rpm:ssä. Otettiin supernatantista talteen 1ml analysointia varten. Suoritettiin uutto prosessi vielä kertaalleen eli näytteitä uutettiin kahdesti.

2.8 Alkukoe

Nikkeligeelikoe tehtiin uutoksille, koska sillä varmistuttiin, oliko niissä tuotettua proteiinia. Siitä voitiin myös päätellä, että kiunka paljon sitä oli näytteessä. (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Pipetoitiin eppendorf-putkeen 300 µl nikkeligeeliä (Midazde, 20-40 mM, sisältää 20 % etanolia, Lot 10028822), koska se sisälsi etanolia (haittaa proteiinin tarttumista nikkeligeeliin). Geeli pestiin kahdesti lisäämällä siihen 800 µl:a milli-Q-vettä ja se sentrifugoitiin 6000 rpm:ssä kahden minuutin ajan.

Otettiin näytteet uutoksista ja laimennettiin ne taulukon 7 mukaisesti. Pipetoinnin jälkeen eppendorf-putkia inkuboitiin sekoittajassa 45 minuutin ajan.

Taulukko 4. Uutos laimennokset

pipetoitiin	Uutto 1 (U1.1) (µl)	Uutto 1 (U1.2) (µl)	Uutto 2 (U2.1) (µl)	Uutto 2 (U2.2) (µl)
Uutos	150	50	150	50
IMAC 30	700	800	700	800
Nikkeli geeli	40	40	40	40

Inkuboinnin päätyttyä sentrifugoitiin eppendorf-putket 6000 rpm:ssä kahden minuutin ajan ja supernatantti kaadettiin pois. Liuotettiin pelletti 500 µl:an IMAC 30 (20mM hepes, 0,5mM KCl, 30mM imidatsoli, 2,5mM MgCl₂, 11.2.10,EVA) puskuria ja sentrifugoidaan 6000 rpm:ssä kahden minuutin ajan. Kahden liuotuksen jälkeen kaadettiin supernatantti pois ja liuotettiin putkissa oleva pelletti 10µl:lla SDS-Page väriä. Putket laitettiin lämpöblokkiin 10 minuutiksi 60 °C:seen (lämpöblokillä denaturoidaan näytteet).

Liiteen 2 ohjeen mukaan valmistettiin ylägeeli(kasausgeeli) ja alageeli(erotusgeeli) sekä suoritettiin SDS-Page ajo.

2.9 Tuotoksen puhdistus affiniteetikromatografilla

Affiniteetikromatografia perustuu proteiinin kinnittymiseen matriksiin heikoin spesifisin sidoksin. Tässä opinnäytetyössäni käytin Ni-pylvästä, jossa on positiivisesti varautuneita Ni^{+2} -ioneja. Nämä ioinit sitovat EphA2-reseptorin monistusvaiheessa kiinnitetyn histidiinihännän. IMAC-puskurin laimella imidatsolipitoisuudella saadaan reseptorin histidiinihäntä kiinnittymään ja korkealla imidatsolipitoisuudella irtoamaan matriksista.^{12,18}

Tuotos puhdistetaan 1 ml:n nikkelipylväällä (Ni sepharose™ 6 fast flow contains 20% ethanol presevrative, GE Healthcare, Lot 10028822). Pylväs puhdistettiin 20%:lla etanolilla virtausnopeudalla 0,5 ml/min 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen huuhdeltiin pylväs milli-Q-vedellä samalla virtausnopeudella yhden tunnin ajan. Pylväs tasapainoitettiin IMAC-30 puskurilla (20mM hepes, 0,5M KCl, 30 mM imidatsoli, 2.5mM MgCl_2 , 0.05% DDM ja 0,01% CHS, Sari, 27.06.11). Ajettiin näyte virtausnopeudella 0,5 ml/min ja eluoitiin tarttumaton proteiini ajon jälkeen IMAC-30 puskurilla (sama kuin tasapainoituksessa) nopeudella 1 ml/min, kunnes kaikki tarttumaton proteiini oli tullut ulos (seurattiin piirturilla, kunnes perustaso oli nolla). Kun tarttumaton proteiini saatiin ulos, eluoitiin EphA2-his proteiini ulos IMAC-500 puskurilla (20mM Hepes,pH 7,3, 0,5M KCl, 2.5 mM MgCl_2 , 500mM imidasoli, 0,05 % DDM, 0,01% CHS, Sari, 27.06.11). Lopuksi puhdistettiin pylväs vedellä ja 20 %:lla etanolilla.

2.10 Analysointi

2.10.1 Agaroosigeelielektroforeesi

Elektroforeesi perustuu sähkövirtaan, joka erottelee molekyylit toisistaan. Agaroosigeelin avulla DNA-pätkät kulkeutuvat sähkövirrassa.

Agaroosielektroforeesissa on plus- ja miinusnapa. DNA sisältää fosfaattiryhmiä, jotka saavat DNA:n varautumaan negatiivisesti ja sen kulkeutumaan kohti miinusnapaa sähkövirrassa. Agaroosin geeliydyttyä, se muodostaa verkkorakenteen, jossa pienemmät fragmentit kulkevat nopeammin ja isommat puolestaan liikkuvat hitaammin, jolloin fragmenttien pituus saadaan selville kuvattaessa geeliä. Geeliin valmistusvaiheessa siihen lisätään etidiumbromidia, jolla se värjäytyy. Kun tutkitaan geeliä UV-valossa ja kuvaataan se kuvantamislaitteella, fragmentit nähdään oranssina, joka johtuu siitä, että etidiumionit ovat tunkeutuneet DNA:ssa nukleiinihappojen emästen väliin.^{4,10}

2.10.2 SDS-page

SDS-PAGE on menetelmä, jonka avulla analysoidaan ja erotetaan proteiineja toisistaan.^{4,15,18}

SDS-PAGE:n (natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelelektroforeesi) toiminnan perustana on agarooriektroforeesin tapaan sähkövirta. Agaroosi geelin tilalla SDS-PAGE:ssa käytetään polyakryyliamidigeeliä, jossa huokoskoko on samaa luokkaa proteiinien kanssa. Siksi tämä menetelmä on hyvä tapa erottaa haluttu proteiini muista proteiineista. Tämä menetelmä perustuu agaroosielektroforeesin tapaan molekyylikoon perusteella erotteluun. SDS-PAGE:ssa SDS on detergentti, joka on negatiivisesti varautunut ja se saa proteiinit nauhamaiseksi muuttamalla ne negatiivisesti varautuneiksi.^{4,15,18}

PAGE:n geeli koostuu ylägeelistä (kasaageeli) ja alageelistä (erotusgeeli). Geeli valmistettiin ja SDS-PAGE ajo suoritettiin Liitteen 1 ohjeen mukaan.

2.10.3 Western blottaus

Western blot on menetelmä, jolla voidaan tunnistaa proteiini, joka on erotettu SDS-PAGE avulla. Erotettu proteiinin vyöhyke kinnitettään vasta-aineen avulla membraaniin.^{17,18}

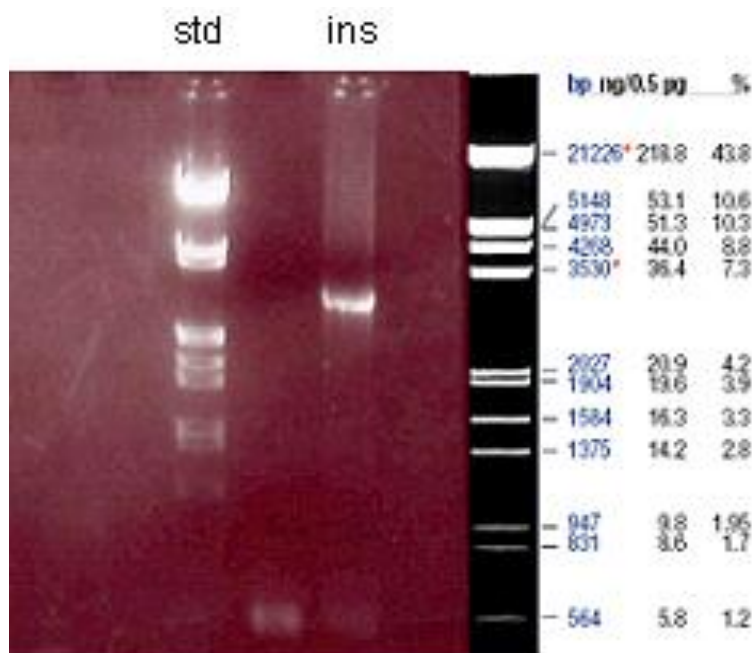
Leikattiin neljä sopivankokoista Whatman-paperia ja leikattiin yksi membraani (Bio-Rad, immun-blot™ PVDF membrane 0,2µl, Lot BR 6101066), jolla proteiini blotattiin. Membraani aktivoitiin laittamalla se viideksi sekunniksi metanoliin, jonka jälkeen se laitettiin veteen. Reikäteline koottiin laittamalla sen väliin yksi geeli, kaksi sientä, neljä watman paperia sekä yksi membraani. Ajopuskuria (1x Trasfer Buffer) kaadettiin ajoastiaan. Geeli ajatettiin 100 voltissa yhden tunnin ajan, jonka jälkeen se laitettiin maitoon (1xPBS, 5% maitojauhetta, KCl, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄) yön yli.

Seuraavaksi pestiin membraani 1xPBS puskurilla (6.10.10, Laura) ja laitettiin ravistelijaan viideksi minuutiksi. Tämän jälkeen membraania inkuboitiin yhden tunnin ajan penta-His vasta-ainetta sisältävässä liuoksessa, jolloin se tunnistaa proteiinin C-terminaaliin kiinnitetyn histidiinitäkin. (Sari Paavilainen, henkilökohtainen tiedonanto)

Inkuboinnin jälkeen pestiin kolmesti membraani 1xPDS + Tween puskurilla (28.5.10, EPÄ), joka saa proteiinin hohtamaan pimeässä. Kehitettiin filmi 500µl:lla ECI-liuoksella [Detection reagent 2 luminol enhancer solution (prod num. 1859696 PIERCE, Lot 6199575) ja detection reagent 1 (peroxide solution, prod. num. 1859699, PIERCE, Lot 6199575)] ja 500µl:lla western blotting substraatilla.

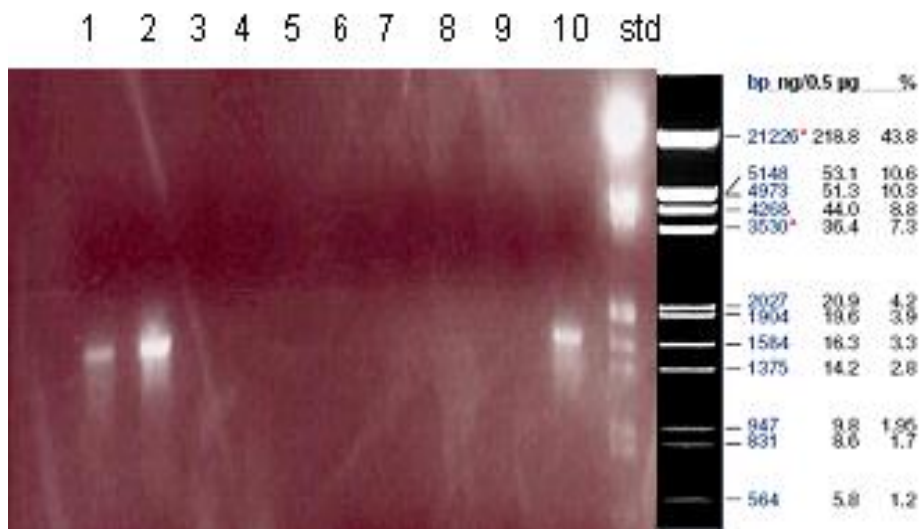
3 TULOKSET JA TARKASTELU

3.1 Koko geenin monistaminen PCR:llä



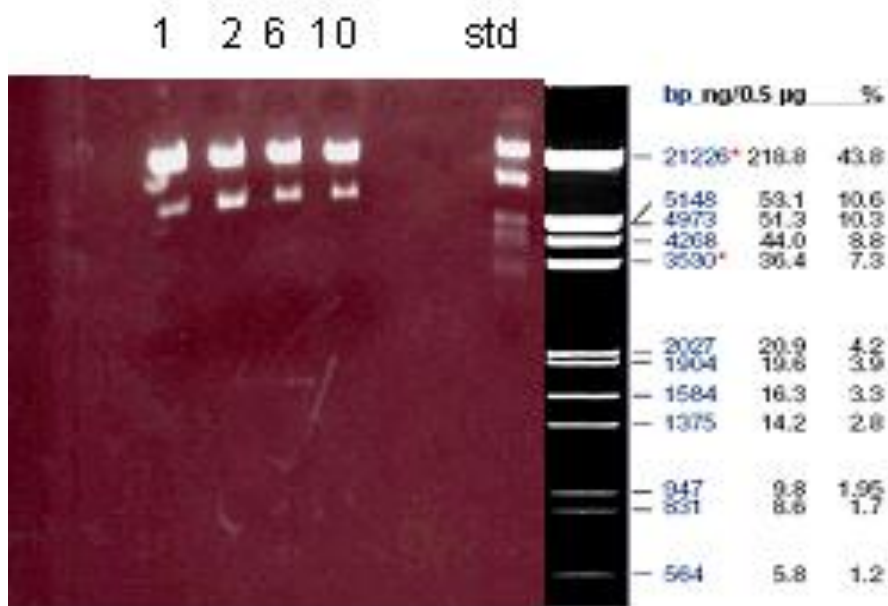
Kuva 4. EphA2- geenin PCR

Kuvassa 4 on kuvattu agarosigeelielektroforeesi PCR-ajon tulokset. Std tarkoittaa λ -DNA-standardia, joka on digestoitu ja sen fragmenttien koot tiedetään (listattu fragmenttien koko kuvan oikealla puolella). Ins tarkoittaa puolestaan inserttiä eli EphA2-reseptorin geeniä. EphA2-geeni on noin 2900 bp:ä ja kuvasta voidaan päätellä, että insertin vyöhyke on kooltaan lähes 2900 bp:ä, kun verrataan sitä standardin vyöhykkeisiin. Kuvan perusteella voidaan todeta, että monistaminen PCR:llä on onnistunut.



Kuva 5. 1-10 Minipreparaattien PCR

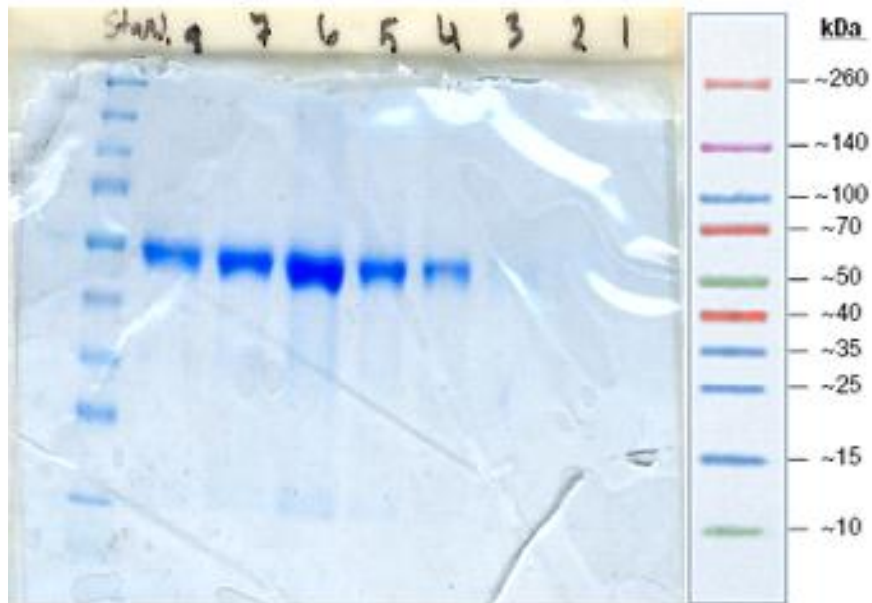
Kuvassa 5 on kuvattu kymmenen minipreparaatin PCR-reaktioiden agarosigeelielektroforeesi. Standardina oli digestoitu λ -DNA. PCR suoritettiin, jotta saataisiin selville, oliko minipreparaateissa oikeaa geeniä oikeinpäin. A2ECD-geeni, jota PCR:ssä monistettiin, oli kooltaan noin 1500 pb:tä. Kuvan perusteella havaitaan kyseinen vyöhyke näytteiden 1,2 ja 10 kohdalla. Minipreparaatit, joissa ei näy vyöhykettä, niissä ei ole EphA2-geeniä ollenkaan tai jos geeni on, niin se ei ole oikeinpäin.



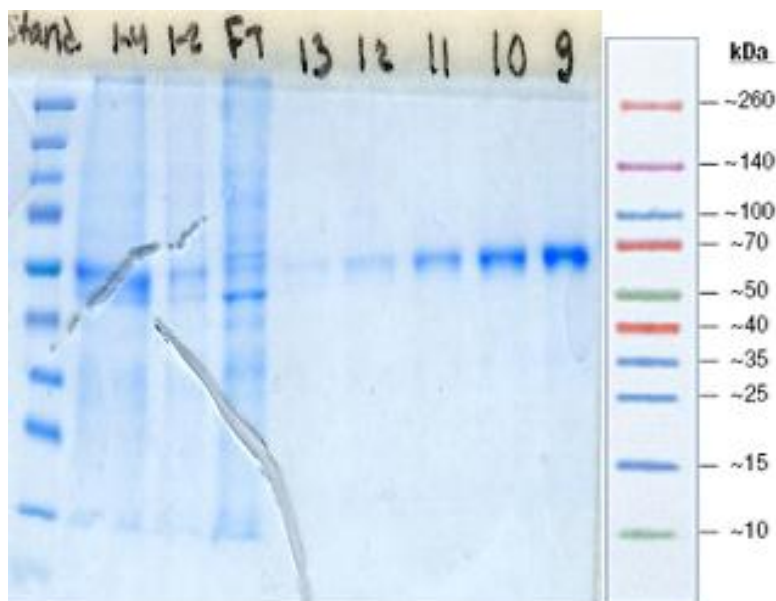
Kuva 6. Digestio 1,2,6 ja 10 Minipreparaateille

Minipreparaatit, joiden kuvan 2 perusteella todettiin sisältävän kyseistä geeniä sekä minipreparaatti 6, jossa ei näkynyt geeniä, digestoitiin BamH1 restriktioentsyymillä. Digestion jälkeen suoritettiin agarosegeelelektroforeesi-ajo, joka kuvattiin. Kuvassa nähdään, että kaikissa miniprepeissä näkyy vyöhyke, joten voidaan todeta, että kaikissa mukaan lukien 6, on insertti, mutta 6:ssa insertti on väärinpäin.

3.2 Proteiinien tuotto ja puhdistus



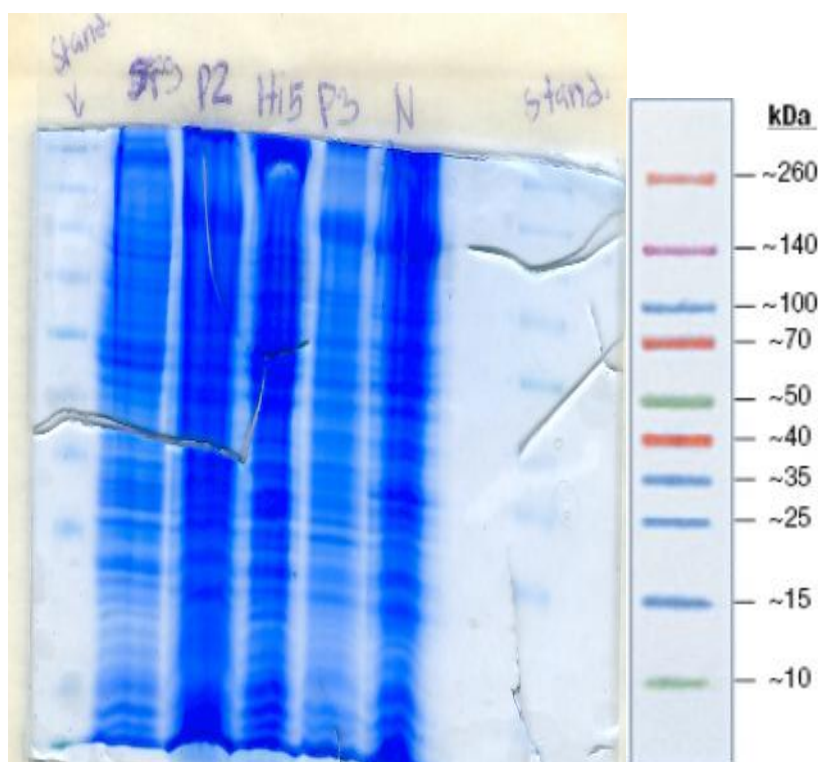
Kuva 7. Efrini- A5 proteiinin puhdistus



Kuva 8. Efrini A5 proteiinin puhdistus

Hi5 hyönteissoluissa tuotettu efrini-A5-ligandi puhdistettiin proteiini A-agarosipylväällä ja siitä ajettiin SDS-PAGE, jotta saatiin selville, missä vaiheessa puhdistusta puhdistettava proteiini tuli ulos. Ennen puhdistusta

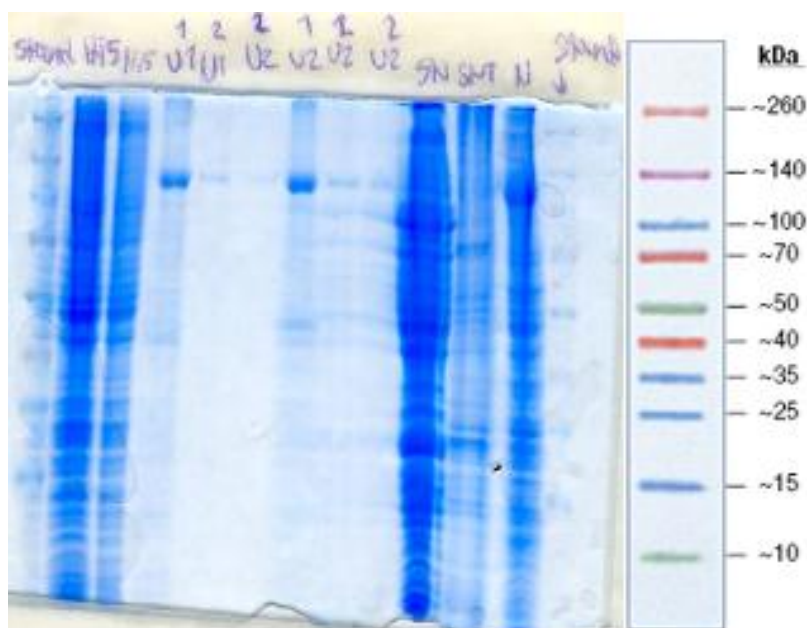
Efriiniligandia oli tuotettu Hi5 hyöntessolussa kahdessa erlenmeyer-pullost, joista kummastakin otettiin näytteet (1-2) ja (1-4). Ft on supernatantti, joka on tullut pylvään läpi kiinnittymisvaiheessa. Näytteille Ft (Flow-through), (1-2) ja (1-4) suoritettiin puhdistus proteiinia A-agarosilla. Näytteiden joukkoon laitettiin 40 µl proteiini A-agarosia ja niitä inkuboitiin huoneen lämpötilassa yhden tunnin ajan. Kuvissa 7 ja 8 näytteet 1-13, joista vyöhyke on muodostunut näytteisiin 3-12 eli proteiinia on tullut ulos näihin eppendorf-putkiin. Kuvan perusteella voidaan päätellä, että eniten proteiinia oli tullut ulos 5-8 näytteistä. (1-2) ja (1-4) näytteissä näyttäisi olevan proteiinia ja myös Ft näytteessä näkyy vyöhyke, joka näyttäisi olevan samalla tasolla oikean proteiinin kanssa, joten kaikki efriiniA5 ei kiinnittynyt pylvääseen.



Kuva 9. EphA2- reseptorin tuotto

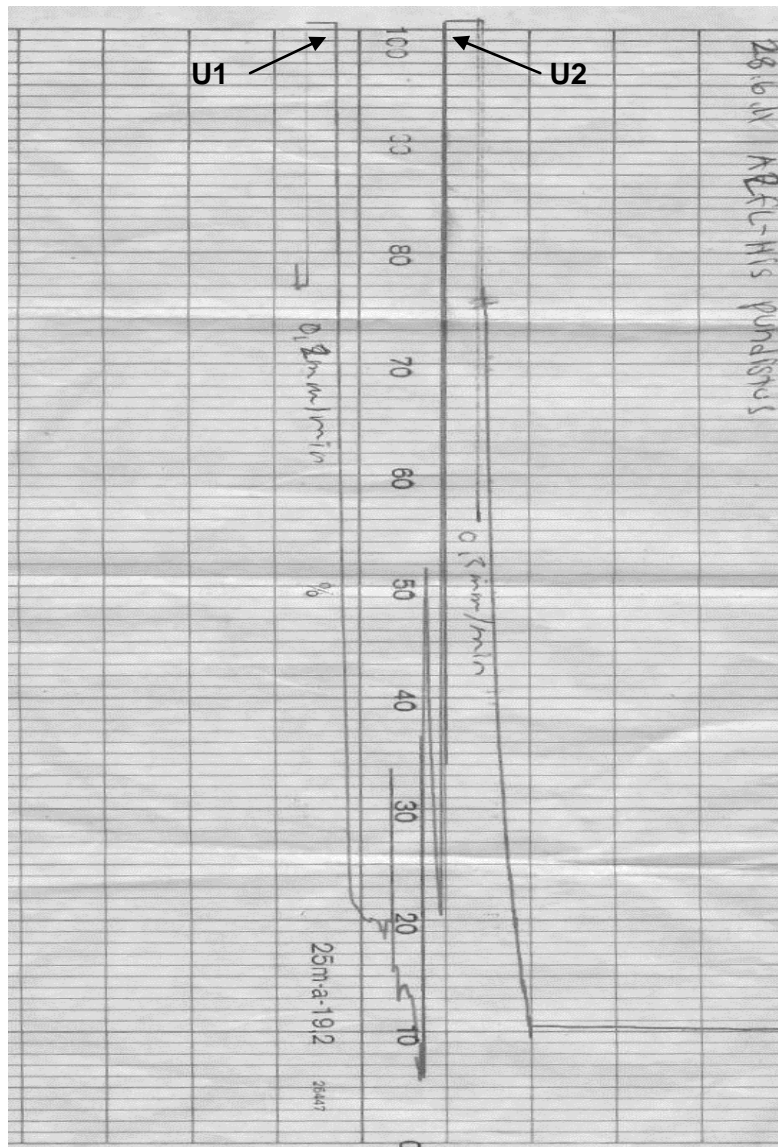
Kuvassa 9 on kuvattu EphA2-proteiinin tuotto eri vaiheissa. Sf9- ja Hi5-hyönteissolut otettiin kontrolleiksi ja kuvasta huomattiin, että niissä oli paljon proteiinia, mutta oikean proteiinin kohdalla ei ole vyöhyhettä, joten niissä ei ole

EphA2-proteiinia. N (P3 virus + Hi5-solut) on puolestaan EphA2-reseptorin tuottovaiheesta Hi5-hyönteissolussa ja siinä näyttää olevan paljon muuta proteiinia kuten myös EphA2-proteiinia (noin 120 kDa). P3 on näyte P3-viruksen tuottovaiheesta ja siitä huomataan, että siinä näkyy kunnan vyöhyke oikean proteiinin kohdalla (120 kDa).



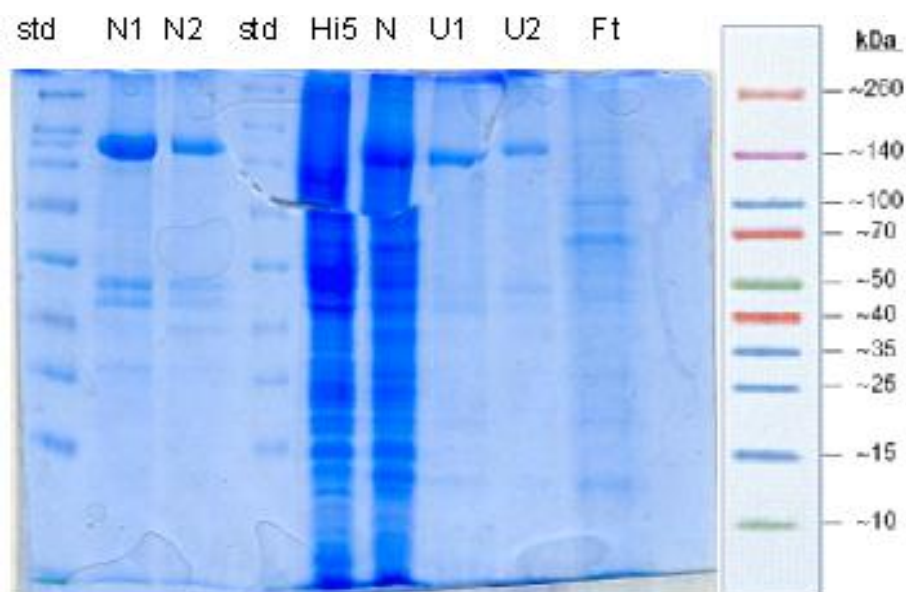
Kuva 10. Alkukoe EphA2-proteiini tuotosta

SDS-PAGE määrittäminen suoritettiin EphA2-reseptorin alkukoe- ja tuottovaiheista (katso Kuva 10). Hi5 solut, jotka sisälsivät EphA2 proteiinia, uutettiin kahdesti, joista otettiin näytteet (U1 ja U2) uuttojen välillä. Uutoksille tehtiin vielä laimennokset (U1.1, U1.2 ,U2.1 ja U2.2) katso Taulukko 3 . Kuvasta nähdään, että kaikissa uutosto-näytteissä oli proteiinin vyöhyke, joka on 120 kDa:n kohdalla. Uutoksista kuitenkin laimeammassa on vaaleampi vyöhyke sekä uutosto 1:ssä että 2:ssä. SN sisältää pesupuskuria, Hi5 soluja sekä EphA2-proteiinia ja siinä näyttäisi olevan vyöhyke 120 kDa:n kohdalla, mutta joukossa on paljon muitakin proteiinia. SNT sisältää samaa kuin SN paitsi, että näyte oli myös lyysattu. Siinä näyttäisi olevan proteiinia runsaasti mukaanlukien haluttua (EphA2) proteiinia. N puolestaan sisälsi Hi5-hyönteissoluja ja EphA2-reseptoria. N:ssä proteiinivyöhykkeitä oli runsaasti, jonka takia halutun proteiinin vyöhykettä ei pysty erottamaan muista.

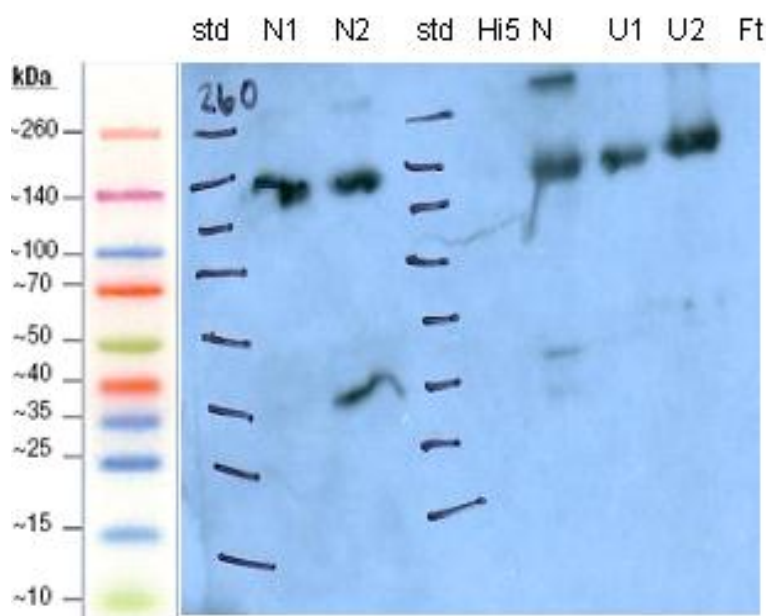


Kuva 11. EphA2-reseptorin puhdistuksen affiniteetikromatogrammi

Kuvassa 11 on kuvattu affiniteetikromatografilla puhdistettu EphA2-reseptori. Uutetut proteiinit puhdistettiin kahdessa erillisessä ajossa, joiden välissä pylväs puhdistettiin ja tasapainoitettiin. Tasapainoituksen ja puhdistuksen aikana piirturi pysäytettiin. Ensin ajettiin kerran uutettu näyte (U1) ja sen jälkeen ajettiin kaksi kertaa uutettu (U2). Kromatogrammissa nähdään kaksi piikkiä, joista voidaan todeta, että ensimmäisen uuton proteiini on tullut ulos ensimmäisen piikin (U1) kohdalla ja toinen piiki kuvaa toisen uutoksen (U2) puhdistusta.



Kuva 12. EphA2-reseptorin puhdistus



Kuva 13. Western Blotaus EphA2:lle

Kuvassa 12 ajettiin SDS-PAGE selvittääksemme, oliko tuotettu proteiini puhdistunut. Huomattiin, että proteiinia oli seuraavissa näytteissä U1, U2, N1 ja N2, koska 120 kDa kohdalla näkyi vyöhyke. Hi5-soluissa oli runsaasti muuta proteiinia. N:ssä näkyi myös runsaasti muuta proteiinia, mutta myös 120 kDa:n kohdalla näkyi vyöhyke. Ft eli pylvästä ulos tulleessa supernatantissa näyttäisi

olevan todella vähän tai ei ollenkaan proteiinia, joten voidaan todeta, että puhdistus on onnistunut.

Kuvassa 13 oli samat näytteet ajettu samassa puskurissa, mutta se blotattiin membraanin penta-his-vasta-aineella (histidiinivasta-aine). Huomattiin, että ylhäällä toteamamme tulokset olivat oikein eli N1, N2, U1 ja U2 sisältävät EphA2-reseptoria. Ft puolestaan ei sisältänyt EphA2:ta, joten voidaan sanoa, että puhdistus oli täysin onnistunut.

4 YHTEENVETO

Opinnäytetyön tavoitteena oli kloonata, tuottaa ja puhdistaa EphA2-reseptoria hyönteissoluista. Koska EphA2-reseptorin geeni on kooltaan pitkä, niin se kloonattiin hyönteissoluista peräisin olevaan vektoriin, sillä hyönteissoluilla voi tuottaa suurista DNA-pätkistä proteiinia.

Yhdistelmä-DNA-tekniikoilla yhdistelmä-DNA-plasmidin tuottaminen onnistui, mutta ligaatiossa sekä transformaatioissa oli jonkinlaisia ongelmia. Ongelma muodostui siitä, että vektori kiinnittyi itsensä kanssa ligaatiossa. Ongelma ratkaistiin suorittamalla vektorille alkaalinen fosfataasi-käsittely, jolloin sen fosfaattipää poistettiin ja sillä estettiin sen kiinnittymistä itsensä kanssa. Muuten kaikki työvaiheet toimivat tehokkaasti.

Tavoitteena oli suorittaa tuotetuille EphA2-reseptoreille ja efriniA5-ligandille sitoutumiskokeita, mutta ajanpuutteen takia se työvaihe jätettiin pois.

Opinnäytetyön käytännönosa oli pitkä prosessi ja kirjoittaminen oli haastavaa, mutta suuren kiitoksen ansaitsee ohjaajani Sari Paavilainen, joka jaksoi olla kärsivällinen ja auttoi minua kaikin voimin.

LÄHTEET

1. Solunetti (2006), Tyroksiinkikinaasireseptorit [online viitattu, 2.6.2012]
Saatavilla:
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/tyrosiinikinaasireseptori/3/>
2. Himanen J.-P. & Nikolov D. B. (2003) Saatavilla:
<http://r245.n90.queensu.ca/Himanen%20and%20Nikolov%202003%20Eph%20receptors%20and%20ephrins.pdf>, The international Journal of Biochemistry & Cell Biology vol.35 sivut 130-134
3. Wikipedia,Kuva EphA2 [online viitattu 6.6.2012] Saatavilla:
<http://en.wikipedia.org/wiki/EPHA2>
4. Päivänsäde E.(2009) EphA3-reseptoriproteiinien ligandia sitovan osan tuotto eri isäntäorganismeissa sekä puhdistus ja karakterisointi. Opinnäytetyö. Turun Ammattikorkeakoulu, Bio-ja elintarviketekniikka.
5. Ikonomou L. & Schneider Y.-J.& Agathos S. N., 2003, Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins, Appl Microbiol Biotechnol vol. 62 sivut 1-21 [viitattu,1.6.2012] Saatavilla:
<http://search.proquest.com.ezproxy.turkuamk.fi/docview/627350142/fulltextPDF/13717647876323EB5B2/1?accountid=14446>
6. Susi Anastasia, 2011, Virusproteiinien tuotto hyönteissoluissa bakuloviruksen avulla.Opinnäytetyö. Turun Ammattikorkeakoulu. Bio-ja elintarviketekniikka.
7. Kojo H.-L. & Kemppainen N. & Keränen P., 2009, PCR-menetelmän optimointi kihomadon DNA:n osoittamiseksi ulosteesta, Pirkanmaan Ammattikorkeakoulu [viitattu, 6.6.2012] Saatavilla:
http://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/6604/Pekka_Keranen.pdf?sequence=1

8. Kuva (vektori) [viitattu, 2.6.2012] Saatavilla:
http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/mol_bio/live/web_enabled/21221P_554757.pdf
9. Wikipedia, PCR, [online viitattu 30.6.2012] Saatavilla:
<http://fi.wikipedia.org/wiki/Polymeraasiketjureaktio>
10. Suominen I. & Pärssinen R. & Haajanen K. & Pelkonen J. (2010),
 Geenitekniikka, Saarijärven Offset Oy, Saarijärvi 2010
11. Vainiopää M. (2011) Mikrobien cDNA:n synteessin automatisointi
 ribosomaalisesta RNA:sta, Opinnäytetyö Jyväskylän
 Ammattikorkeakoulu. Laboratorioala Saatavilla:
https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/27434/vainiopaa_marianna.pdf?sequence=1
12. Aitomäki E. & Eerikäinen T. & Leisola M. ym. (2002),
 Bioprosessitekniikka, WSOY, Helsinki
13. Wikipedia, Bakulovirus, [viitattu, 2.6.2012] Saatavilla:
<http://fi.wikipedia.org/wiki/Bakulovirus>
14. Virtanen Sanna Pauliina, 2008, β 1,3-Glukosyyli transferaasin tuoton
 optimointi ja puhdistus, Bakulovirukset [viitattu, 1.6.2012] Saatavilla:
<http://tutkielmat.uta.fi/pdf/gradu03193.pdf> (Virtanen S. (2008) , Pro-
 gradu-tutkielma. Tampereen yliopisto. Lääketieteellisen teknologian
 instituutti.)
15. Solunetti, 2006, SDS-PAGE [online, viitattu, 1.6.2012], Saatavilla:
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/
16. Solunetti, 2006, Western Blottaus [online, viitattu, 1.6.2012], Saatavilla:
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kaksiulotteinen_page/2/
17. Solunetti, 2006, Digestio [viitattu, 6.6.2012] Saatavilla:
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/digestio/2/>

18. Heikkilä Tapio, (2007), Eph reseptoriproteiinin tuotto ja puhdistus, Opinnäytetyö, Turun Ammattikorkeakoulu, Bio-ja elintarviketekniikka.

5 LIITTEET

Agaroosigeelielektroforeesi ohjeet

1. otetaan 0,6g agaroosia ja lisätään joukkoon 1xTEA-puskuria
2. Muunennetaan mikrossa noin 3 minuuttia ja jäähdytetään vedessä (60°C:ksi), jonka jälkeen lisätään 4 µl Etidiumbromidia
3. Kaadetaan geeli tarjottimelle ja Laitetaan kampa.
4. Annetaan jäähtyä noin 20 minuuttia ja laitetaan geeli kammioon, johon laitetaan 1xTEA ajopuskuria.
5. Pipetoidaan näytteet kuoppiin, mutta ennen sitä laitetaan näytteisiin 6xDNA LB väriä.
6. ajetaan geeli 100 voltilla noin 30 minuuttia.

SDS-PAGE geelin valmistus- ja suoritushjeet (2 geeliä)

Taulukko 5. SDS-PAGE ylägeeli

Kasausgeeli	
Pipetoitiin	Määrä (µl)
30% akryyliamidi	325
Milli-Q-vettä	1525
Tris-HCl pH 6,8	625
10% SDS	25
10% ammoniumpersulfaatti	12,5
TEMED (lisätään vasta kun laitetaan levylle)	2,5
Kokonaistilavuus	2500

Taulukko 6. SDS-PAGE alageeli

Erotusgeeli	
Pipetoitiin	määrä (µl)
30% akryyliamidi	3200
Milli-Q-vettä	2700
Tris-HCl pH 6,8	2000
10% SDS	80
10% ammoniumpersulfaatti	40

TEMED (lisätään vasta kun laitetaan levyille)	4
Kokonaistilavuus	8000

1. Kaadettiin ylhäällä olevien taulukoiden mukaiset reagenssit kahteen falcon-putkeen.
2. Koottiin lasit telineisiin
3. Erotusgeelin joukkoon lisättiin TMED:tä ja kaadettiin levyille
4. Kaadettiin 200 µl etanolia geelin päälle, jotta geeli jähmettyisi tasaisesti.
5. annettiin geelin jähmettyä noin 20 minuuttia
6. Poistettiin etanoli kuivaamalla käsipaperilla
7. Lisättiin kasaageeli ja laitettiin kampa paikalle
8. Annettiin geelin jähmettyä

Valmisteltiin näytteet SDS-Page ajoa varten.

9. Sentrifuoitiin kolmen minuutin ajan 12000 rpm:ssä
10. Ottettiin supernatantista 20 µl näytettä ja laitettiin päälle 5 µl SDS-page puskuria (6x SDS puskuri)
11. Laitettiin eppendorf-putket lämpöblokkiin 95°C:een viideksi minuutiksi.
12. Asetettiin geelit ajokoneeseen ja laitettiin ajopuskuria siihen.

13. Pipetoidaan Kuoppiin 12 µl näytettä/kuoppa sekä 5 µl proteiini standardia(fermentas, spectratm™ multicolor broad range protein, Lot 00059011).
14. Ajettiin geeli ensin 100 voltilla, kunnes se kävi läpi Erotusgeelin, sen jälkeen ajettiin kasaageeli 170 voltilla.
15. Ajon jälkeen suoritettiin geelille pesu vedellä. Laitettan geeli purkkiin, jonka joukkoon laitettiin vettä ja lämmitettiin mikrossa kolmen minuutin (vaihdettiin vesi yhden minuutin välein) ajan.
16. Kaadettiin vesi pois ja laitettiin geelin joukkoon väriä (fermentas, pageBlue protein, Lot 00023569). Lämmitettiin mikrossa 25 sekunnin ajan ja laitettiin 50 rpm:ään 20 minuutin ajaksi.
17. Kaadettiin väri pois ja laitettiin veteen yön yli.
18. Pestiin geeli vielä seuraavana päivänä vedellä
19. Kuvattiin geeli.